VERMEHRUNG VON PNEUMOCYSTIS CARINII IN GEWEBEKULTUREN

Andreas Opp

1979

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 26 81 77

Aus der Kinderklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. K. Betke

VERMEHRUNG VON PNEUMOCYSTIS CARINII IN GEWEBEKULTUREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Andreas Opp
aus
München
1979

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Otmar Goetz
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Klaus Betke
Dekan: Prof. Dr. med. Wolfgang Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 6. November 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Herrn Prof. Dr. med. Otmar Goetz danke ich für die Überlassung des Themas und für seinen fachlichen Rat während meiner Arbeit im Virus-Labor der Friedrich Baur-Stiftung.

Mein Dank gilt auch Herrn Privatdozenten Dr. med. Peter Peller für die kritische Durchsicht des Manuskripts sowie Frau Nickel, Frau Gramm und Frau Stellmach für technischen Rat und ihre Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Inhalt

	Seite
A.Einleitung	1
Vorkommen der Pneumocystis carinii-Pneumonie	1
Diagnose	3
Beschreibung des Erregers	4
Färbemethoden	6
Behandlung und Prophylaxe	7
Kulturversuche mit Pneumocystis carinii	8
B.Untersuchungsziel	10
C.Eigene Versuche	11
1.Material	11
Versuchstiere	11
Pharmaka	11
Menschliches Lungengewebe	11
Zellkulturen	12
Wachstumsmedium	13
Modifizierte Giemsa-Farblösung	13
2.Methoden	14
Gewebekulturen	14
Erzeugen der Rattenpneumozystose	14
Aufarbeiten und Verimpfung des Lungenmaterials	15
Subkulturen	16
Vermehrungsfaktor	17
Kontrolle	18
Lungentupfpräparate	18
Ausstriche	18
Beurteilung der Präparate	19
3.Ergebnisse	20
Auswirkung der Glukokortikoid- und Chloramphenikol-behandlung auf die Versuchstiere	20
Wachstum von aus Rattenlungen gewonnenen Pneumozysten auf den Gewebekulturen	22
Wachstum der aus einer menschlichen Lunge gewonnenen Pneumozysten auf den Gewebekulturen	28
D.Diskussion	29
E.Zusammenfassung	37
F.Literatur	38

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535722_0072

A.Einleitung

Vorkommen der Pneumocystis carinii-Pneumonie:

Die durch den Erreger Pneumocystis carinii hervorgerufene interstitielle Pneumonie zählt zu den zellulären interalveolären Lungenerkrankungen, die durch infektiöse, physikalische, immunologische und zahlreiche andere Ursachen entstehen können (9, 39).

1909 von Chagas (7) und 1910 von Carini (5) als Entwicklungsstadium verschiedener Trypanosomenarten gedeutet, wurde der Erreger schließlich von Delanoe und Delanoe (8) als eigene Spezies erkannt und als Pneumocystis carinii bezeichnet.

Ammich (1) und Benecke (3) unterschieden die interstitielle plasmazelluläre Pneumonie 1938 von anderen Säuglingspneumonien.

Vanêk und Jírovek (49) stellten 1951 den Zusammenhang der Erkrankung mit dem Auftreten von Pneumocystis carinii her.

Während die interstitielle plasmazelluläre Pneumonie außerhalb des europäischen Festlandes sehr selten beobachtet wurde (13), war sie hier während und nach dem II.Weltkrieg

eine in Entbindungsheimen und Kinderkliniken endemische gefürchtete Krankheit (19) mit einer Letalität von bis zu 60 Prozent (13).

Dieser sogenannte "endemisch-infantile" Typ (19), der vorwiegend Säuglinge vor dem 4.Lebensmonat befiel, ist seit den fünfziger Jahren in Europa nicht mehr aufgetreten (16). Sicher waren soziale Umstände wie strenge hygienische Maßnahmen (16) und verbesserte Ernährung der Kinder (19) an diesem Erfolg beteiligt. Darauf weisen auch neuere Berichte über erkrankte vietnamesische Kriegswaisenkinder hin (12, 46). Hughes (22, 23) stellt die Beziehung zwischen Eiweißunterernährung und Pneumocystis carinii-Pneumonie heraus.

Doch erklären diese Faktoren das Verschwinden der interstitiellen plasmazellulären Pneumonie als einer typischen Heimerkrankung nicht vollständig (16).

Stattdessen trat Pneumocystis carinii in der Folgezeit in völlig anderem Zusammenhang als Erreger einer lebensbedrohenden Pneumonie auf. 1962 berichtete Kossel (32) von 13 älteren Kindern, die in der Folge langdauernder Kortikosteroidtherapie eine schwere Pneumozystose entwickelten. Mit der zunehmenden Anwendung immunsuppressiver und zytostatischer Medikamente häuften sich nun auch aus Übersee Meldungen über das Auftreten dieses sogenannten

"Kind-Erwachsenen"-Typs (19) der Pneumocystis carinii-Pneumonie. Die Berichte betreffen Kinder und Erwachsene, die

- wegen anderer Erkrankungen einer langdauernden Kortikosteroidbehandlung ausgesetzt wurden (15, 32)
- nach Organtransplantationen immunsuppressive Medikamente erhielten (48)
- wegen maligner Erkrankungen zytostatisch behandelt wurden (21, 36)
- oder an einer angeborenen Schwäche oder erworbenen Erkrankung des Immunsystems litten (30, 47)

Diagnose:

Die Diagnose der Pneumocystis carinii-Pneumonie wird wegen ihres seltenen Auftretens meist spät gestellt. Erste unspezifische Symptome sind Husten, zunehmende Tachypnoe und bisweilen Fieber (16). Der Allgemeinzustand verschlechtert sich zusehends. Der Patient entwickelt Atemnot und eine aschfahle Zyanose (19), wobei der Auskultationsbefund gewöhnlich unauffällig bleibt.

Das Thorax-Röntgenbild kann unscharf-fleckige Verschattungen über allen Lungenfeldern aufweisen (51).

Die Komplementbindungsreaktion nach Vivell (52) zeigt

wegen der immunsuppressiven Therapie häufig ein negatives Ergebnis (16). Empfindlichere fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen (14, 40) scheinen hier diagnostisch weiterzuhelfen. Bei Immundefektsyndromen wurde eine gleichzeitige Eosinophilie beschrieben (30).

Das Sputum weist meist zahlreiche andere Erreger auf. Mischinfektionen wie mit Zytomegalievirus sind wegen der ursächlichen Abwehrschwäche die Regel (45).

Am sichersten läßt sich die Diagnose durch den direkten Nachweis der Pneumozysten stellen. Die offene Lungenbiopsie ist bei den meist schwerkranken Patienten nicht zu verantworten. In den Vereinigten Staaten wird das zum mikroskopischen Nachweis nötige Material bevorzugt durch transthorakale Nadelbiopsie gewonnen (2, 28), doch scheint die Bronchialspülung mittels Bronchoskopie ähnlich sichere Ergebnisse zu bringen (17, vgl.auch 6).

Beschreibung des Erregers:

Frühe elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen einwandige und doppelwandige Organismen mit komplexen Innenstrukturen, gelegentlich kernhaltigen Innenkörpern und verzweigten Membranstrukturen (24).

Campbell (4) unterteilt aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen drei Formen des Organismus: kleine, dünn-

wandige, pseudopodienreiche Formen; große, dünnwandige, glykogenreiche Formen, die vereinzelt über Öffnungen in ihrer Außenmembran miteinander in Verbindung stehen; und schließlich dickwandige zystische Formen mit Innenkörpern, die den kleinen dünnwandigen Formen ähnlich sind. Viele dickwandige Formen enthalten keine Innenkörper, sind offensichtlich kollabiert und weisen vereinzelt Defekte in ihrer Außenwand auf.

Campbell (4) ordnet diese Formen nach den theoretischen Vorstellungen von Vanêk (50) in einen möglichen Entwicklungszyklus von Pneumocystis carinii ein:

Vielgestaltige sogenannte kleine Trophozoiten zeichnen sich durch Pseudopodien und Filopodien aus, die sie vermutlich bewegungsfähig machen. Sie wachsen heran zu unbeweglicheren großen Trophozoiten, die sich entweder teilen oder genetisches Material austauschen. Darauf verdicken sie die Außenmembran und werden zu Zysten, in denen sich bis zu acht Sporozoiten entwickeln. Diese verlassen schließlich die Zysten, die als leere Halbmondformen zurückbleiben, und werden wieder zu kleinen Trophozoiten.

Obwohl die taxonomische Position noch nicht restlos geklärt ist, rechnen die meisten Autoren Pneumocystis carinii heute zu den Protozoen.

Zahlreiche Untersuchungen weisen darauf hin, daß es sich bei Pneumocystis carinii um ein weltweit verbreitetes Lebewesen handelt, das sich nur langsam vermehrt und bei normaler

Abwehrlage des Wirtes apathogen ist. Viele Gesunde weisen Antikörper gegen Pneumocystis carinii auf (19, 41). Erst eine Immunschwäche, wie etwa bei jungen Säuglingen, die noch keine ausreichende Antikörperbildung besitzen, kann zum Ausbruch der Pneumocystis carinii-Pneumonie und zu zunehmender respiratorischer Insuffizienz führen (16).

Zudem gibt es Subtypen von Pneumocystis carinii, die bestimmte Wirte bevorzugen: Rattenpneumozysten unterscheiden sich serologisch von beim Menschen beobachteten (13).

Färbemethoden:

Viele der üblichen Färbemethoden stellen Pneumocystis carinii gar nicht oder nur schlecht dar (Übersicht: 13).

Die Hämatoxylin-Färbung nach Böhmer (13) läßt eine gute Beurteilung von Pneumocystis carinii zu, fällt aber zu ungleichmässig aus. Die Toluidin-Blau-Färbung nach Chalvardjian zeigt deutlich die Zystenmembran, aber keine Innendetails des Erregers (10). Auch die Silberfärbung nach Gomori stellt vorwiegend die Außenmembran dar; bisweilen lassen sich zwei "anführungsstrichförmige" Innenkörper erkennen (31). Diese Färbung ist besonders für Gewebeschnitte geeignet.

In durch Bronchialspülung gewonnenem Material, aber auch in Lungentupfpräparaten stellt die als typische Protozoen-

färbung bekannte modifizierte Giemsa-Färbung im Gegensatz zu anderen Färbungen die meisten Bestandteile von Pneumocystis carinii dar (13): Ungleichmässig über das Präparat verteilt, liegen intensiv blau gefärbte Einzelkerne, aber auch 2- und 4--kernige Formen in rötlich angefärbten wolkenartigen Haufen von wechselnder Größe eng beisammen. Besonders schön stellt sich die achtkernige Zystenform dar, die im Verhältnis zu den anderen Formen mit einer Häufigkeit von etwa 1:50 bis 1:200 auftritt und als absolut charakteristisch für Pneumocystis carinii angesehen wird (13): In einer zartroten, oval bis unregelmässig gestalteten Membran liegen kreisförmig angeordnet acht etwa 1 µ grosse blauviolette Kerne, die von einem hellen Hof umgeben sind; manchmal rückt ein Kern in das Zentrum dieses Kreises.

Behandlung und Prophylaxe:

Neben unumgänglichen symptomatischen Maßnahmen wurden bereits zahlreiche Medikamente gegen die Pneumocystis carinii-Pneumonie versucht (Übersicht: 13). 1958 führten Ivady und Paldy (25) das Pentamidin in die Behandlung ein. Wegen seiner ernsten Nebenwirkungen wie Anämie (26), Hypoglykämie und Urämie (29) sollte heute zunächst der Kombination Trimethoprim-Sulfamethoxazol der Vorzug gegeben werden (35). Dieses Medikament

scheint ähnlich wirksam gegen Pneumocystis carinii zu sein und zeigt wesentlich weniger Nebenwirkungen (37, 38, 42).

Die prophylaktische Gabe von Trimethoprim-Sulfamethoxazol kann die Erkrankung gefährdeter Patienten erfolgreich vermeiden (20). Die vorbeugende Ultraviolettlichtbestrahlung konnte zumindest im Tierexperiment den Ausbruch einer Pneumozystose nicht verhindern (18).

Kulturversuche mit Pneumocystis carinii:

Die Ermittlung weiterer gegen die Pneumozystose wirksamer Medikamente sowie die Klärung von Natur, Vermehrungszyklus und Infektionsmodus des Erregers stießen bisher auf erhebliche Schwierigkeiten; denn bis 1975 schien es nicht möglich zu sein, Pneumocystis carinii in Kulturen zur Vermehrung zu bringen.

Vermehrungsversuche auf zahlreichen Bakteriennährböden, Pilznährböden, Protozoennährböden und in Gewebekulturen brachten keinen Erfolg (13, 44). Zwar sah Jahn (27) bereits 1957, daß Pneumocystis carinii auf Hühnerembryonalzellkulturen mehrere Wochen erhalten bleibt, er konnte jedoch keine Vermehrung feststellen.

1975 berichteten Pifer und Mitarbeiter (43) in einer vorläufigen Mitteilung, sie hätten Pneumocystis carinii auf

embryonalen Hühnerlungenepithelzellen zur Vermehrung gebracht. In zwei Wochen erreichten sie eine begrenzte Vermehrung der zystischen Formen auf das 100-fache der ursprünglich verimpften Zahl (44).

Latorre und Mitarbeiter (34) teilten 1977 mit, sie hätten aus Rattenlungen gewonnene Pneumozysten innerhalb von vier Monaten in drei von sechs verschiedenen Gewebekulturen auf das rechnerisch 65 536-fache vermehrt. Als Zellarten verwendeten sie Vero-Zellen aus der Niere einer grünen afrikanischen Meerkatze, Chang-Leberzellen menschlicher Herkunft und menschliche embryonale Lungenfibroblasten.

B.Untersuchungsziel

Da die früheren Versuche,Pneumocystis carinii in Gewebekulturen zu vermehren, bei ähnlichem Versuchsaufbau durchweg unbefriedigend verlaufen waren, wollten wir insbesondere die Versuche von Latorre und Mitarbeitern (34) nachvollziehen.

Hierzu wollten wir in weißen Laborratten nach der von Weller (53) angegebenen, durch Goetz (13) verbesserten Methode durch kombinierte Glukokortikoid- und Chloramphenikolgabe eine Pneumocystis carinii-Pneumonie erzeugen, um die für unsere Versuche notwendigen Pneumozysten zu gewinnen.

Zusätzlich wollten wir versuchen, Pneumozysten aus einer menschlichen Lunge zur Vermehrung zu bringen.

Die Verarbeitung des pneumozystenhaltigen Lungengewebes und die wöchentliche Verimpfung auf Subkulturen sollte in Anlehnung an das Verfahren von Latorre und Mitarbeitern (34) erfolgen.

Neben Vero-Zellen und menschlichen embryonalen Lungenfibroblasten dienten uns auch Vervet-Affennierenzellen für unsere Vermehrungsversuche.

Mit der Methode von Latorre und Mitarbeitern (34) wollten wir überprüfen, ob eine Vermehrung von Pneumocystis carinii stattfindet. Als Färbemethode bevorzugten wir die modifizierte Giemsa-Färbung.

Um festzustellen, ob eine zeitlich unbegrenzte Vermehrung von Pneumocystis carinii stattfindet, sollten die Kulturen, in denen wir eine Vermehrung feststellten, wenigstens ein Jahr lang fortgeführt werden.

C. Eigene Versuche

1. Material:

Versuchstiere:

Als Versuchstiere dienten uns junge 50-80 g schwere weiße weibliche SPF-Sprague-Dawley-Ratten (WIGA-Versuchstierzuchtanstalt, Sulzfeld), die zu je 2-5 Stück in regelmäßig gesäuberten Käfigen gehalten wurden. Ihre Ernährung erfolgte mit Preßfutter und Wasser nach Belieben.

Pharmaka:

a) Prednisolon (Prednisolon-21-hemisuccinat-Natrium; Solu-Decortin-H, Merck, Darmstadt)

b) Cortisol (Hydrocortisonacetat; 21-Acetoxy-11ß,17-dihydroxy-4-pregnen-3,20-dion; Scheroson F Kristallsuspension, Schering AG, Berlin)

c) Chloramphenicol (5% Chloramphenicol in 1,3-Butandiol; Paraxin-Ohrentropfen, Boehringer, Mannheim)

Menschliches Lungengewebe:

Das von uns verarbeitete Lungengewebe stammte von einer 23-jährigen Patientin, die im Juli 1977 durch hypoxisches

Rechtsherzversagen aufgrund einer Pneumocystis carinii-
-Pneumonie ad exitum kam.

> Die Patientin hatte von 1961 an eine zunehmende Leukozytopenie und Granulozytendepression entwickelt. Seit ihrer Jugend litt sie an zahlreichen infektiösen Erkrankungen. Eine 1973 durchgeführte Beckenkammbiopsie zeigte eine deutliche Atrophie der Granulopoese.
> Im Juni 1977 mußte die stark abgemagerte Patientin zum wiederholten Mal stationär aufgenommen werden. Sie litt an Dyspnoe und Tachypnoe. Ein massiver Röntgenbefund stand im Gegensatz zum völlig unauffälligen auskultatorischen Befund.
> Durch Bronchialspülung gelang schließlich der Nachweis von Pneumocystis carinii. Die anschließende Behandlung mit Bactrim und zuletzt mit Pentamidin konnte den Erkrankungsprozeß nicht mehr aufhalten.

Die Lungenteile, die wir nach der Obduktion erhielten, wiesen einen massiven Befall mit Pneumocystis carinii auf.

Zellkulturen:

Folgende Gewebekulturen kamen in unseren Versuchen zur Anwendung:

a) Vero-Zellen (Permanente Zellkulturen, die aus der Niere einer grünen afrikanischen Meerkatze gewonnen wurden und in unserem eigenen Labor auf Kulturröhrchen weitervermehrt wurden; Fa.Flow Laboratories)
b) Menschliche embryonale Lungenfibroblasten (Primäre Zell-

kulturen "Flow 2000"; Fa.Flow Laboratories)

c) Vervet-Affennierenzellen (Primäre Zellkulturen der Fa. Bio-Merieux)

Wachstumsmedium:

4 ml 8,4 %iges $NaHCO_3$
1 ml 2000 mM L-Glutamin
1 ml mit 10 000 I.E. Penicillin
1 ml mit 10 000 I.E. Streptomycin
und 10 ml fötales Kälberserum
wurden mit Dulbecco-MEM (minimal essential medium) auf 100 ml aufgefüllt.

Modifizierte Giemsa-Farblösung:

Giemsa-Farbe (Fa.Merck) wurde nach Angaben des Herstellers in Glyzerin und Methanol (Verhältnis 1:1) gelöst, 24 Stunden stehen gelassen und dann filtriert. Von dieser Stammlösung gaben wir je 2 Tropfen auf 1ml aqua dest.

2.Methoden:

Gewebekulturen:

Aus einem Kulturröhrchen, in dem sich ein guter Zellrasen ausgebildet hatte, entfernten wir das Wachstumsmedium. Nach kurzzeitigem Zusatz einer 0,25 %igen Trypsinlösung wurde diese verworfen und das Kulturröhrchen bei 37°C inkubiert, bis sich unter dem Mikroskop bei 36-facher Vergrößerung die Lösung des Zellverbandes zeigte. Nach Zugabe von 4-6 ml Wachstumsmedium erhielten wir durch wiederholtes Aufschütteln eine Suspension von einzelnen Zellen. Von dieser Suspension gaben wir je 2 ml auf ein neues Kulturröhrchen und inkubierten es bei 37°C. Nach einigen Tagen hatten sich die neuen Zellrasen ausgebildet und konnten zur Verimpfung der Pneumozysten verwendet werden.

Wir benutzten ausschließlich 2 ml-Kulturröhrchen.

Erzeugen der Rattenpneumozystose:

Wir teilten 24 Versuchstiere in 3 Gruppen ein.

Gruppe 1 (10 Tiere) erhielt fünf mal pro Woche in geeigneter Verdünnung folgende Pharmaka parenteral verabreicht:

1.-2.Wo:	1,25	mg	Prednisolon	i.m. +	8	mg Chloramphenicol i.p.
3.-4.Wo:	2,5	mg	Prednisolon	i.m. +	10	mg Chloramphenicol i.p.
5.-6.Wo:	5	mg	Prednisolon	i.m. +	13	mg Chloramphenicol i.p.
7.-9.Wo:	5	mg	Cortisol	i.m. +	13	mg Chloramphenicol i.p.
10.-18.Wo:	7,5	mg	Cortisol	i.m. +	15	mg Chloramphenicol i.p.

Gruppe 2 (10 Tiere) erhielt fünf mal pro Woche folgende Pharmaka:

1.-2.Wo: 1,25 mg Cortisol i.m. + 8 mg Chloramphenicol i.p.
3.-4.Wo: 2,5 mg Cortisol i.m. + 10 mg Chloramphenicol i.p.
5.-12.Wo: 5 mg Cortisol i.m. + 13 mg Chloramphenicol i.p.

Gruppe 3 (4 Tiere) diente als Kontrollgruppe.

Wöchentlich einmal bestimmten wir das Gewicht der Tiere. Acht Wochen nach Beginn der Injektionen töteten wir in wöchentlichen Abständen je ein Tier aus jeder Gruppe. Die Lungen wurden aseptisch entnommen. Von jeder Lunge fertigten wir Tupfpräparate an.

Aufarbeiten und Verimpfung des Lungenmaterials:

Verwendet wurden pneumozystenhaltige Teile einer menschlichen Lunge sowie die Lungen von 11 Tieren, die einen mittelstarken bis starken Befall mit Pneumocystis carinii aufwiesen. Die Verarbeitung erfolgte steril.

Wir zerkleinerten die Lunge und spülten sie mit Wachstumsmedium von überschüssigem Gewebe und Blut frei.

Zusammen mit 5 ml Wachstumsmedium wurden einige Gewebebrocken in einem Ten Broeck Homogenisator (Fa.Bellco) vorsichtig zermahlen.(Der kapillare Spalt zwischen Kolben und Wand dieses Homogenisators beträgt 100-150 /u).

Das entstandene Homogenisat wurde nun bei 2000 U/min (entsprechend 500 x g) 10 Minuten zentrifugiert. Dabei sedimentierten vor allem die Gewebereste.

Nun pipettierten wir den Überstand behutsam ab.

Je 0,4 ml dieser abpipettierten Suspension wurden kräftig in 1,6 ml Wachstumsmedium aufgeschüttelt.

Die auf diese Weise erhaltene Suspension gaben wir auf 2 ml-Kulturröhrchen, in denen sich ein guter Zellrasen ausgebildet hatte. Zu diesem Zweck wurde das Wachstumsmedium der noch unbeimpften Zellen verworfen und diese mit der aus der Verarbeitung der Lungen gewonnenen Suspension überschichtet.

Nach der Beimpfung wurden die Kulturröhrchen bei 37°C inkubiert.

Von jeder Lunge beimpften wir je zwei Verozellkulturen und zwei Fibroblastenzellkulturen. Für die Versuche auf Vervet-Affennierenzellen verwendeten wir zur Beimpfung Material aus Subkulturen von Vero-Zellen. Dabei erfolgte die Beimpfung wie das Anlegen einer Subkultur.

Subkulturen:

In wöchentlichen Abständen bildeten wir Subkulturen der verimpften Pneumozysten:

Die Kulturröhrchen wurden behutsam geschüttelt, um eventuell an der Zellschicht adhärente Pneumozysten zu lösen. Darauf wurde das Nährmedium in ein Zentrifugenglas dekantiert,

bei 2000 U/min 15 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand bis auf etwa 0,5 ml verworfen.

Nun schüttelten wir das Sediment kräftig auf. Nachdem wir 30 /ul für Ausstriche zur Beurteilung entnommen hatten, verdünnten wir die verbliebene Suspension in 4 ml Wachstumsmedium und überschichteten damit je zwei frische Gewebekulturen, die wiederum eine Woche bei 37°C inkubiert wurden.

Vermehrungsfaktor:

Die ursprünglich verimpfte Erregermenge wurde jede Woche im doppelten Volumen verdünnt. Zusätzlich wurde dabei auch Material für Ausstriche entnommen.

Legen wir diese wöchentliche 1:2-Verdünnung zugrunde, so müßte die Pneumozystendichte in den Ausstrichen von zwei aufeinanderfolgenden Subkulturen auf über die Hälfte abnehmen,falls sich der Erreger nicht vermehren würde.

Sollte die Erregerdichte dagegen deutlich weniger stark abnehmen, gleichbleiben oder sogar zunehmen, so wäre dies als Beweis für eine Vermehrung der Pneumozysten auf den betreffenden Gewebekulturen zu werten. Beispielsweise würde bei gleichbleibender Erregerdichte in jeder Passage eine Vermehrung auf wenigstens das Doppelte, also um den Faktor 2 stattfinden.

Dieser Sachverhalt ließe sich auch mit der Formel

$X \times 2^n$ umschreiben, wobei X die Zahl der ursprünglich verimpften Pneumozysten und n die n-te Subkultur bezeichnen würde. In der n-ten Subkultur hätte folglich bei gleichbleibender Erregerdichte eine Vermehrung auf das 2^n-fache stattgefunden.

Kontrolle:

Von jeder Zellart wurden nicht beimpfte Kontrollgewebekulturen angelegt, von denen Subkulturen und Ausstriche wie von den beimpften Versuchsgewebekulturen angefertigt wurden.

Lungentupfpräparate:

Mit einem Skalpell wurde ein Gewebestück aus der Lunge geschnitten und mit der Schnittfläche mehrmals kräftig auf einen Objektträger aufgedrückt. Der Objektträger wurde anschließend luftgetrocknet, flammenfixiert und eine Stunde lang mit Giemsa-Farblösung überschichtet. Anschließend wurde die Farblösung abgegossen, das Präparat abgespült und getrocknet.

Ausstriche:

15 µl des mit steriler Eppendorf-Pipette entnommenen Materials (siehe unter "Subkulturen") wurden auf einen Objektträger aufgetropft, luftgetrocknet und flammenfixiert.

Wir überschichteten die Präparate mit der Giemsa-Farblösung,die wir 1 Stunde einwirken ließen. Anschließend wurde die Farbe abgegossen, die Präparate wurden abgespült und getrocknet.

Beurteilung der Präparate:

Die Präparate wurden mit Ölimmersion bei 1000-facher Vergrößerung beurteilt. Die Identifikation der Pneumozysten erfolgte nach den unter "Färbemethoden" aufgeführten Kriterien.

Die Präparate wurden mittels folgender einfacher Unterscheidung befundet:

Ø = keine Pneumozyste im Ausstrich zu finden
(+)= nur wenige 1-kernige Formen im gesamten Ausstrich
\+ = viele 1- bis 4-kernige Formen, die in Gruppen zusammenliegen
++ = sehr viele 1- bis 4-kernige Formen, daneben mögliche achtkernige Zysten

3.Ergebnisse:

Auswirkung der Glukokortikoid- und Chloramphenicolbehandlung auf die Versuchstiere:

Körpergewicht

Abbildung 1 zeigt die mittlere Gewichtszunahme der mit Glukokortikoiden und Chloramphenicol behandelten Ratten der Gruppen 1 und 2 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren.

Die in den ersten 6 Wochen mit Prednisolon behandelten Versuchstiere der Gruppe 1 wiesen einen deutlich geringeren Gewichtszuwachs auf als die Kontrolltiere, wuchsen aber beständig. Erst unter der Weiterbehandlung mit Cortisol ab der 7.Woche zeigte ihr Gewicht einen deutlichen Rückgang und hielt sich ab der 10.Woche bei 140-150 g.

Die bereits anfangs mit Cortisol behandelten Tiere der Gruppe 2 zeigten ab der 4.Woche einen deutlichen Gewichtsrückgang und wogen ab der 5.Woche konstant etwa 90 g.

Die Tiere der Kontrollgruppe nahmen stetig an Gewicht zu.

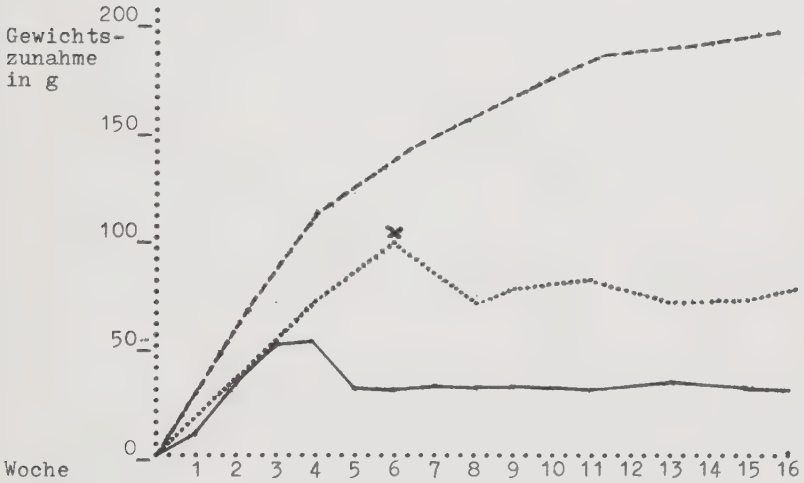
Letalität und Lungenbefund

Acht Wochen nach Beginn der Injektionen töteten wir in wöchentlichen Abständen je ein Tier aus Gruppe 1 und 2.

Die vier Tiere aus Gruppe 1, die wir bis zur 12.Woche

Abb. 1

Mittlere Gewichtszunahme der mit Glukokortikoiden und Chloramphenicol behandelten Tiere der Gruppen 1 und 2 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren



x = Zeitpunkt des Wechsels von Prednisolon auf Cortisol

..... = Gewichtszunahme der Versuchstiere Gruppe 1 (10 Tiere)

_____ = Gewichtszunahme der Versuchstiere Gruppe 2 (10 Tiere)

------ = Gewichtszunahme der unbehandelten Tiere (4 Tiere)

töteten, zeigten keinen Pneumozystenbefall. Die vier Tiere dieser Gruppe, die wir nach der 13.Woche töteten, wiesen einen mittelstarken bis starken Befall ihrer Lungen mit Pneumocystis carinii auf.

Die Lungen der Tiere aus Gruppe 2 zeigten bereits ab der 8.Woche einen deutlichen Befall mit Pneumocystis carinii. Ein Tier dieser Gruppe, das wir in der 12.Woche töteten, wies einen massiven Pilzbefall der Lunge auf. Seine Lunge konnte nicht verarbeitet werden.

Nach Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnittpräparate, die wir von einigen der pneumozystenhaltigen Lungen anfertigten, ließen eine massive Verbreiterung des Interstitiums und das für die Pneumozystose bezeichnende rosa-schaumige Material in den Alveolen erkennen.

In der 11.Woche starben aus Gruppe 1 und Gruppe 2 je zwei Tiere. Ihre Lungen kamen nicht zur Verarbeitung.

Die Lungen der Kontrolltiere waren frei von Pneumocystis carinii.

Insgesamt legten wir von 11 pneumozystenhaltigen Rattenlungen Kulturreihen an.

Wachstum von aus Rattenlungen gewonnenen Pneumozysten auf den Gewebekulturen:

Tabelle 1 zeigt das Wachstum der aus den einzelnen Rattenlungen gewonnenen Pneumozysten auf Vero-Zellkulturen.

Tab.1

Zusammenfassende Übersicht über die Befunde auf Vero-Gewebekulturen in den ersten 2 Monaten nach Beimpfung mit Pneumocystis carinii

Tier No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Kontrolle
Lungenbefund	++	++	(+)	++	++	(+)	+	+	(+)	++	(+)	
nach 1 Woche	++	++	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	n.beurt.	(+)	Ø
nach 1 Monat	+	++	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	n.beurt.	Ø	Ø
im 2.Monat nach Verimpfung	++	++	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	++	Ø	Ø

Ø = keine Pneumozyste im Ausstrich zu finden
(+) = nur wenige 1-kernige Formen im gesamten Ausstrich
\+ = viele 1- bis 4-kernige Formen, die in Gruppen zusammenliegen
++ = sehr viele 1- bis 4-kernige Formen, daneben mögliche achtkernige Zysten

Erfolg brachte die Verarbeitung der stark befallenen Lungen der Tiere 1,2,4 und 10: Bis in den 2.Monat hinein war trotz wöchentlicher 1:2-Verdünnung der ursprünglichen Pneumozystenmenge keine Abnahme der Pneumozystendichte in den Ausstrichen zu erkennen.

Die Kulturen, die wir von den schwächer befallenen Lungen anlegten, wiesen anfangs nur wenige 1-4-kernige Formen in den Ausstrichen auf, die keinen Rückschluss auf eine mögliche Vermehrung erlaubten. Bereits im 2.Monat waren die Ausstriche nicht mehr von Ausstrichen der mituntersuchten Kontrollgewebekulturen zu unterscheiden.

Diese enthielten niemals Gebilde, die zu einer Verwechslung mit Pneumozystenformen hätten führen können.

Die Beobachtungen auf menschlichen embryonalen Lungenfibroblasten unterschieden sich nicht von denen auf Vero--Zellen.

Die erfolgreich angegangenen Kulturen der Tiere 1,2,4 und 10 setzten wir nun weiter fort. Auf Vero-Zellen ließ sich bis zum 5.Monat (Tier 2,4 und 10) bzw. bis zum 6.Monat (Tier 1) keine Abnahme der Erregerdichte erkennen (Tab.2).

Eine ähnliche Dauer ergab sich auf menschlichen embryonalen Lungenfibroblasten. Jedoch war die Anzahl von Pneumocystis carinii in den Ausstrichen dieser Gewebekulturen durchweg geringer als auf Vero-Zellen. Auch ließen sich

---

Tab.2

Zusammenfassende Übersicht über die Befunde auf Vero--Gewebekulturen über einen Verlauf von 10 Monaten nach Verimpfung der jeweiligen Lunge

Tier No.	1	2	4	10	Kontrolle
Lungenbefund	++	++	++	++	
1 Woche	++	++	+	n.beurt.	Ø
1 Monat	+	++	+	n.beurt.	Ø
bis 3 Monate	++	++	+	++	Ø
bis 5 Monate	++	++	+	++	Ø
6 Monate	++	(+)	Ø	Ø	Ø
8 Monate	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø
10 Monate	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
nach Verimpfung					

Ø = keine Pneumozyste im Ausstrich zu finden
(+) = nur wenige 1-kernige Formen im gesamten Ausstrich
\+ = viele 1- bis 4-kernige Formen, die in Gruppen zusammenliegen
++ = sehr viele 1- bis 4-kernige Formen, daneben mögliche achtkernige Zysten

---

mögliche achtkernige Zysten deutlich seltener beobachten. (Tab.3).

Schließlich nahm die Erregerdichte in den Ausstrichen deutlich ab. 11 Monate nach Verimpfung konnten wir in keiner

Tab.3

Zusammenfassende Übersicht über die Befunde auf Gewebekulturen von menschlichen embryonalen Lungenfibroblasten über einen Verlauf von 11 Monaten nach Verimpfung der jeweiligen Lunge

Tier No.	1	2	4	10	Kontrolle
Lungenbefund	++	++	++	++	
1 Woche	++	n.beurt.	+	n.beurt.	Ø
1 Monat	++	+	(+)	n.beurt.	Ø
3 Monate	+	(+)	+	++	Ø
5 Monate	+	+	+	+	Ø
6 Monate	++	+	+	++	Ø
8 Monate	+	(+)	(+)	Ø	Ø
10 Monate	+	Ø	Ø	Ø	Ø
11 Monate	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

nach Verimpfung

Ø = keine Pneumozyste im Ausstrich zu finden
(+) = nur wenige 1-kernige Formen im gesamten Ausstrich
\+ = viele 1- bis 4-kernige Formen, die in Gruppen zusammenliegen
++ = sehr viele 1- bis 4-kernige Formen, daneben mögliche achtkernige Zysten

der Kulturen auch nur vereinzelte Pneumozystenformen beobachten.

4 bis 6 Monate nach der ersten Verimpfung auf Vero-Zellen unternahmen wir weitere Züchtungsversuche auf Vervet-Affen-

nierenzellen. Zur Beimpfung diente dabei Material aus Subkulturen auf Vero-Zellen.

Tabelle 4 zeigt, daß bei diesen Versuchen lediglich mögliche Frühformen (1-kernige Formen) des Erregers gefunden wurden, die wir bei der Serie von Tier 1 allerdings über mehrere Monate beobachten konnten. Für den Nachweis einer Vermehrung reichten die Befunde nicht aus.

Tab.4

Zusammenfassende Übersicht über die Befunde auf Vervet-Affennierenzellkulturen

Tier No.	1	2	4	10	Kontrolle
Beimpft mit Subkultur auf Vero-Zellen im	6.Mo.	5.Mo.	5.Mo.	4.Monat	
Befund des Impfmaterials	++	++	+	++	
bis zum 1.Monat	(+)	+	+	(+)	Ø
2.Monat	+	Ø	Ø	Ø	Ø
3.Monat	+				Ø
4.Monat	Ø				Ø
nach Beimpfung					

Ø = keine Pneumozyste im Ausstrich zu finden
(+) = nur wenige 1-kernige Formen im gesamten Ausstrich
\+ = viele 1- bis 4-kernige Formen, die in Gruppen zusammenliegen
++ = sehr viele 1- bis 4-kernige Formen, daneben mögliche achtkernige Zysten

---

Wachstum der aus einer menschlichen Lunge gewonnenen Pneumozysten auf den Gewebekulturen:

. Das von uns verarbeitete Lungengewebe enthielt ausgereifte achtkernige Zysten. Die Verarbeitung stimmte mit der der Rattenlungen überein.

Dennoch befanden sich in den Vero-Zellkulturen bereits eine Woche nach der Beimpfung nur noch 1- bis 4-kernige Pneumozystenformen, die in den folgenden Subkulturen ständig an Zahl abnahmen und nach der 9.Woche nicht mehr nachweisbar waren.

Auf menschlichen embryonalen Lungenfibroblasten schienen sich die vom Menschen gewonnenen Pneumozysten besser zu entwickeln. In der 6.Subkultur fanden sich Gebilde, die an ausgereifte achtkernige Zysten erinnerten. Im dritten Monat nach Verimpfung konnten wir jedoch nur noch vereinzelt 1-kernige Formen beobachten.

Auf Vervet-Affennierenzellen fanden sich über 10 Wochen hinweg mögliche 1- bis 4-kernige Formen von Pneumocystis carinii, ohne daß es zum Auftreten der beweisenden achtkernigen Zyste kam.

D.Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Vermehrungsfähigkeit von Pneumocystis carinii in Gewebekulturen geprüft. Neben Pneumozysten aus einer menschlichen Lunge wurden hierzu Pneumozysten verimpft, die mittels kombinierter Glukokortikoid-Chloramphenicol-Behandlung weißer Laborratten gewonnen wurden (13).

Die Gewichtszunahme der mit Glukokortikoiden und Chloramphenicol behandelten Tiere blieb weit hinter der unbehandelter Kontrolltiere zurück.

Einerseits hemmt Chloramphenicol die Übertragung aktivierter Aminosäuren (33) und damit auch die Proteinsynthese und Antikörperbildung. Andererseits führen die Glukokortikoide zu einer direkten Zytolyse der Lymphozyten (54). Somit kommt es zu einer Aktivierung der offenbar latent vorhandenen Pneumozysten, die sich in der deutlichen Erkrankung der meisten von uns behandelten Tiere ausdrückte.

Die gleichzeitige Gabe von Chloramphenicol reduziert die von Frenkel (11) benötigten Kortikoideinzeldosen von 25 mg auf einen Bruchteil; zudem schützt sie vor Infektionen der Tiere: Nur eines unserer Versuchstiere erkrankte an einer Mykose. Allerdings blieb die Todesursache der 4 ver-

storbenen Tiere ungeklärt.

Bei der Gabe sehr niedriger Kortikoiddosen, wie wir sie verwendeten, ist mit einem raschen Abfall unter den therapeutisch wirksamen Serumspiegel zu rechnen. So könnte sich die Tatsache erklären, daß das an sich viermal wirksamere, aber wasserlösliche Prednisolonpräparat, das wir anfangs bei Versuchstiergruppe 1 verwendeten, der später benutzten Cortisol-Kristallsuspension in der Wirkung deutlich unterlegen war. Erst 7 Wochen nach Umstellen der Behandlung auf die Cortisol-Kristallsuspension wiesen die Tiere der Gruppe 1 einen deutlichen Pneumozystenbefall auf. Die davor getöteten Tiere dieser Gruppe zeigten dagegen keinen Befall.

Lediglich in 4 unserer 11 Kulturreihen ließ sich mit der von uns zugrunde gelegten einfachen Methode eine Vermehrung der Pneumozysten feststellen. In allen vier Fällen handelte es sich um Kulturen, die mit Material aus stark mit Pneumozysten befallenen Lungen beimpft worden waren. 6 der 7 anderen Kulturreihen wurden von Lungen angelegt, die einen deutlich schwächeren Pneumozystenbefall zeigten. Diese Befunde könnten sich folgendermaßen erklären:

a) Offensichtlich müssen die Lungen die infektiösen Erreger in ausreichender Dichte enthalten. Eventuell ist die

Vermehrungsfähigkeit sogar von der Zahl der achtkernigen Zysten abhängig, die die Sporozoiten enthalten. Pifer (44) beobachtete bei ihren Versuchen auf embryonalen Hühnerlungenepithelzellen, daß die Zystenzahl nach anfänglichem Anstieg wieder abnahm, wenn fast ausschließlich Trophozoiten zur Beimpfung verwendet wurden. Latorre (34) teilt mit, Pneumozysten aus einer Ratte, die nur 5 Wochen mit Cortison behandelt wurde, hätten sich nicht vermehrt. Pifer (44) zählte Toluidin-Blau-O--gefärbte Zysten aus und konnte bei einer Beimpfung mit weniger als 1×10^3 Zysten/$2{,}4 \times 10^7$ Zellen auf embryonalen Hühnerlungenepithelzellen keine Vermehrung feststellen.

b) Die Verarbeitungsmethode von Latorre (34) versprach zunächst eine größere Erregerausbeute aus den Lungen als das Vorgehen von Pifer und Mitarbeitern (44), die die Lungen lediglich in antibiotikahaltigem Phosphatpuffer kräftig schüttelten: Der Ten Broeck Homogenisator zerstört das Lungengewebe und setzt so vermehrt Pneumozysten frei, die mit ihrer Größe von 0,8 - 8 µ den 100 -150 µ weiten Spalt des Homogenisators passieren können. Eine Schädigung der Erreger durch dieses Verfahren ist aber nicht auszuschließen. Vorgeschädigte

Pneumozysten dürften jedoch nicht vermehrungsfähig sein: Pifer (44) stellte fest, daß mit Hitze vorbehandelte, morphologisch aber intakte Pneumozysten keine Vermehrung zeigten. Ein schonenderes Verfahren ist daher anzustreben, um eine größere Ausbeute an vermehrungsfähigen Erregern zu erreichen.

Eine Quantifizierung der Pneumozysten war wegen der von uns gewählten Färbemethode nicht möglich, da die Organismen sehr ungleichmäßig im Ausstrich verteilt waren, in Haufen zusammenlagen und nicht deutlich voneinander abgrenzbar waren. Dennoch legten wir unseren Versuchen die Giemsa-Färbung zugrunde, da sie zur morphologischen Identifizierung von Pneumocystis carinii am besten geeignet ist. Pifer (44) gelang es ebenfalls nicht, die Trophozoiten zahlenmäßig zu bestimmen; diese Arbeitsgruppe zählte nur die Toluidin--Blau-O-gefärbten dickwandigen Zysten über Raster aus.

Auffallend ist, daß sich einwandfrei rosettenförmige achtkernige Zysten mit unserer Ausstrichtechnik und Färbemethode nur sehr selten darstellen ließen und wir uns deshalb auf die anderen in der Einleitung erwähnten morphologischen Kriterien stützen mußten.

Während Pifer und Mitarbeiter (44) auf den von ihnen verwendeten Zellen in 12 Tagen eine Vermehrung der dickwandigen Zysten bis auf das 100-fache der ursprünglich verimpften Menge erreichten, errechneten Latorre und Mitarbeiter (34), die ihre Subkulturen bis in den 4.Monat hinein anlegten, auf ihren Zellarten eine Vermehrung auf das 65 536-fache. Bezogen auf die Serien, in denen wir eine sichere Vermehrung erreichten, können wir diese Angaben bestätigen: Bis zur 14.Subpassage ließ sich in diesen Fällen mit Sicherheit trotz jeweils erfolgter 1:2-Verdünnung keine Abnahme der Pneumozystendichte beobachten, woraus sich rechnerisch eine Vermehrung von wenigstens 2^{14}, also auf das 16.384-fache der ursprünglich verimpften Menge ergibt.

Die tatsächliche Vermehrungsrate liegt jedoch sicher höher. Da wir die Kultur der Pneumozysten über einen wesentlich längeren Zeitraum hin ausführten, als es bisher versucht wurde, konnten wir - ein gutes Angehen der Kultur vorausgesetzt - auf Vero-Zellen und menschlichen embryonalen Lungenfibroblasten eine Vermehrung von Pneumocystis carinii mindestens bis in den 6.Monat erreichen.

Jedoch scheint eine zeitlich unbegrenzte Vermehrung von Pneumocystis carinii bisher nicht möglich zu sein. So konnten wir den Erreger in unseren Kulturausstrichen bestenfalls bis zum 10.Monat nach Verimpfung beobachten. Über diesen Zeitraum hinaus gelang uns sein mikroskopischer Nachweis in keinem einzigen Fall. Vero- und menschliche embryonale Lungenfibroblastenzellen scheinen sich aber gleichermaßen gut für diese doch relativ lange Kulturhaltung zu eignen.

Eine sichere Vermehrung von Pneumocystis carinii auf Vervet-Affennierenzellen ließ sich mit der von uns angewendeten Methode nicht nachweisen. Wir konnten lediglich sehen, daß sich die Trophozoiten auf dieser Zellart über einen längeren Zeitraum erhalten können. Möglicherweise haben diese Versuche aber auch zu spät begonnen.

Latorre (34) konnte auf Rhesusaffennierenzellen keine Vermehrung beobachten.

Die Versuche, Pneumozysten, die wir aus einer menschlichen Lunge gewonnen hatten, zur Vermehrung zu bringen, zeigten, daß Erregerfrühformen auf den von uns verwendeten Zellarten über einen längeren Zeitraum erhalten bleiben. Den Nachweis einer Vermehrung konnten wir nicht erbringen.

Doch geht aus dem bisher Gesagten hervor, daß die Unversehrtheit und Zahl der Pneumozysten im Impfmaterial für eine erfolgreiche Kultur offenbar entscheidend ist, so daß unsere Beobachtungen nicht gegen eine mögliche Vermehrung von Pneumozysten menschlicher Herkunft sprechen.

Pifer und Mitarbeiter (44) geben an, Pneumozysten aus einer menschlichen Lunge zur Vermehrung gebracht zu haben. Sie erreichten auf embryonalen Hühnerlungenepithelien eine Vermehrung der dickwandigen Zysten auf das 10-fache.

Die Kultur von Pneumocystis carinii ermöglicht Untersuchungen zu Biochemie, Morphologie und Lebenszyklus des Erregers, wie sie bereits von Pifer und Mitarbeitern (44) eingeleitet worden sind:

Diese Arbeitsgruppe baute in autoradiographischen Studien Uridin, Thymidin und Aminosäuren, welche mit Tritium markiert waren, in embryonale Hühnerlungenepithelzellen ein, die sie anschließend mit Pneumocystis carinii beimpften. Aus der Aufnahme der markierten Substanzen in die Pneumozysten schließen sie auf einen Stoffaustausch zwischen Wirtszellen und Pneumozysten und auf die Synthese von Desoxyribonukleinsäure, Ribonukleinsäure und Proteinen in den Zysten selbst (44).

Weiter beobachteten sie einzelne Organismen in der Sykes-Moore Kammer. Sie sahen, daß die kleinen Trophozoiten sich

an die Wirtszellen anlagern, aber nicht in diese eindringen. Anschließend lösen sich die Trophozoiten von der Wirtszelle, runden sich ab und wachsen zu dickwandigen Zysten heran, in denen sich acht Sporozoiten entwickeln. Schließlich durchdringen die Sporozoiten die Zystenwand und werden zu kleinen Trophozoiten, die sich erneut an Wirtszellen anlagern. Diese Beobachtungen von Pifer und Mitarbeitern (44) stimmen sehr gut mit den in der Einleitung erwähnten Vorstellungen über den Lebenszyklus von Pneumocystis carinii überein (4, 50).
Ungeklärt ist bisher, warum Pneumocystis carinii nur mit Hilfe bestimmter lebender Zellen seinen Entwicklungszyklus durchlaufen kann.

Darüber hinaus macht die Kultur von Pneumocystis carinii serologische Untersuchungen und die Testung gegen den Erreger wirksamer Pharmaka möglich.

Weiteren Untersuchungen bleibt es vorbehalten, eine schonendere Gewinnungsmethode zu entwickeln und weitere Zellarten zu erproben, um die Vermehrung von Pneumocystis carinii auf Gewebekulturen zu verlängern oder zu verbessern.

E. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Vermehrungsfähigkeit von Pneumocystis carinii in Gewebekulturen von Vero-Zellen, menschlichen embryonalen Lungenfibroblasten und Vervet-Affennierenzellen geprüft.

Zu diesem Zweck wurden 20 weiße Laborratten mit Glukokortikoiden und Chloramphenicol behandelt, um eine Lungenpneumozystose dieser Tiere zu erzeugen.

11 Tiere wiesen darauf einen deutlichen Befall mit Pneumozysten auf. Ihre Lungen konnten zur Beimpfung der Gewebekulturen verwendet werden. Zudem verimpften wir Pneumozysten aus einer menschlichen Lunge.

Pneumozysten aus 4 besonders stark befallenen Rattenlungen zeigten sowohl auf Vero-Zellen wie auf menschlichen embryonalen Lungenfibroblasten eine Vermehrung auf das wenigstens 16 384-fache der ursprünglich verimpften Erregerzahl.

Auf menschlichen embryonalen Lungenfibroblasten konnten wir Pneumocystis carinii sogar über einen zeitlichen Verlauf von 10 Monaten am Leben erhalten.

Eine zeitlich unbegrenzte Vermehrung gelang jedoch nicht.

Pneumozysten aus den weniger stark befallenen Rattenlungen zeigten keine eindeutige Vermehrung.

Den Nachweis einer Vermehrung von Pneumozysten aus einer menschlichen Lunge konnten wir nicht erbringen.

Auf Vervet-Affennierenzellen zeigte Pneumocystis carinii keine sichere Vermehrung.

F.Literatur

1) AMMICH,O.:
Über die nichtsyphilitische interstitielle Pneumonie des ersten Kindesalters.
Virchows Arch.302:539 (1938)

2) BECROFT,D.M.O., und J.M.COSTELLO:
Pneumocystis carinii pneumonia in siblings: Diagnosis by lung aspiration.
New Z.med.J.64:273 (1965)

3) BENECKE,E.:
Verh.Dtsch.Ges.Path.31:402 (1938)

4) CAMPBELL,W.G.:
Ultrastructure of Pneumocystis in Human Lung. Life Cycle in Human Pneumocystosis.
Arch.Path.93:312 (1972)

5) CARINI,A.:
Formas de eschizogonia do Trypanozoma lewisi.
Commun.Soc.Med.Sao Paulo:204 (1910)

6) CAUBARRERE,M.D. - HUGHES,W.T.:
Correspondence.
New Engl.J.Med.298:741 (1978)

7) CHAGAS,C.:
Nova tripanozomiaza humana. Estudos sobre la morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n.gen., n.sp., agente etiologio de nova entidade morbida de homen.
Mem.Inst.Oswaldo Crus (Rio) 1:159 (1909)

8) DELANOE,P., und M.DELANOE:
Sur les rapports des kystes de Carinii du poumon des rats avec le Trypanosoma Lewisii.
C.R.Acad.Sci.155:658 (1912)

9) DREISIN,R.B., M.I.SCHWARZ, A.N.THEOFILOPOULOS und R.E.STANFORD:
Circulating immune complexes in the idiopathic interstitial pneumonias.
New Engl.J.Med.298:353 (1978)

10) ESTERLY,J.A., und N.E.WARNER:
Pneumocystis Carinii Pneumonia. Twelfe cases in patients with neoplastic lymphoreticular disease.
Arch.Path.80:433 (1965)

11) FRENKEL,J.K., J.T.GOOD und J.A.SHULTZ:
Latent Pneumocystis infection of rats, relapse and chemotherapy.
Lab.Invest.15:1559 (1966)

12) GIEBINK,G.S., L.SHOLLER, T.P.KEENAN, R.A.FRANCIOSI und P.G.QUIE:
Pneumocystis carinii Pneumonia in Two Vietnamese Refugee Infants.
Pediatrics 58:115 (1976)

13) GOETZ,O.:
Die Ätiologie der interstitiellen sogenannten plasmazellulären Pneumonie des jungen Säuglings.
41.Beiheft zum Archiv für Kinderheilkunde (1960)

14) GOETZ,O.:
Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen bei interplasmazellulärer Pneumonie.
Mschr.Kinderheilk.113:194 (1965)

15) GOETZ,O., und B.OHRT:
Cortison-Langzeitbehandlung und interstitielle Pneumonie.
Mschr.Kinderheilk.112:163 (1964)

16) GOETZ,O., und P.PELLER:
Pneumocystis-carinii-Pneumonien.
Med.Klin.69:1774 (1974)

17) GOETZ,O., P.PELLER und K.MANTEL:
Diagnose einer Pneumocystis Carinii Pneumonie durch Bronchialspülung.
Klin.Wschr.54:743 (1976)

18) GOETZ,O., und L.RENTSCH:
Prüfung der Wirkung von UV-Licht und Medikamenten auf Pneumocystis carinii im Tierversuch.
Zeitschr.Kinderheilk.79:305 (1957)

19) HUGHES,W.T.:
Pneumocystis carinii Pneumonia.
New Engl.J.Med.297:1381 (1977)

20) HUGHES,W.T., S.KUHN, S.CHAUDHARY, S.FELDMAN, M.VERZOSA, R.J.A.AUR, C.PRATT und S.L.GEORGE: - -
Successfull chemoprophylaxis for pneumocystis carinii pneumonitis.
New Engl.J.Med.297:1419 (1977)

21) HUGHES,W.T., R.A.PRICE, H.KIM, T.B.COBURN, D.GRIGSBY und S.FELDMAN:
Pneumocystis Carinii Pneumonitis in children with malignancies.
J.Pediatr.82:404 (1973)

22) HUGHES,W.T., R.A.PRICE und F.SISKO:
Protein calorie malnutrition, a host determinant for Pneumocystis carinii pneumonitis.
Pediat.res.7:370 (1973)

23) HUGHES,W.T., R.A.PRICE, F.SISKO, W.S.HAVRON, A.G.KAFATOS, M.SCHONLAND und P.M.SMYTHE:
Protein calorie malnutrition, a host determinant for Pneumocystis carinii pneumonitis.
Amer.J.dis.child.128:44 (1974)

24) HUNEYCUTT,H.C., R.W.ANDERSON und W.S.HENDRY:
Pneumocystis carinii Pneumonia: Case Studies with Electron Microscopy.
Amer.J.Clin.Path.41:411 (1964)

25) IVADY,G., und L.PALDY:
Eine neue Behandlungsmethode der interstitiellen plasmazellulären Pneumonie der Frühgeborenen.
Mschr.Kinderheilk.106:10 (1958)

26) IVADY,G., L.PALDY und M.KOLTAY:
Pneumocystis carinii pneumonia.
Lancet No.7490:616 (Vol.I 1967)

27) JAHN,E., und R.E.ROLLER-GUSINDE:
Zur Serologie und Klinik der interstitiellen plasmazellulären Pneumonie.
Klin.Wschr.35:37 (1957)

28) JAKOBS,J.B., C.VOGEL, R.D.POWELL und V.T.DeVITA:
Needle biopsy in Pseudocystis carinii pneumonia.
Radiology 93:525 (1969)

29) JEHN,U., und K.P.HELLRIEGEL:
Therapie der Pneumocystis carinii-Pneumonie im Erwachsenenalter.
Dtsch.Med.Wschr.102:488 (1977)

30) JOSE,D.G., R.H.GATTI und R.A.GOOD:
Eosinophilia with Pneumocystis Carinii Pneumonia and immune deficiency syndroms.
J.Pediatr.79:748 (1971)

31) KIM,H.K., W.T.HUGHES und S.FELDMAN:
Studies of morphology and immunofluorescence of Pneumocystis carinii.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med.141:304 (1972)

32) KOSSEL,A.:
Interstitielle plasmazelluläre Pneumonie beim älteren Kind als Folge langdauernder Corticosteroidbehandlung.
Dtsch.Med.Wschr.87:1133 (1962)

33) KUSCHINSKY,G., und H.LÜLLMANN:
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie.
6.Aufl. (1974)

34) LATORRE,C.R., A.J.SULZER und L.G.NORMAN:
Serial propagation of Pneumocystis carinii in cell line cultures.
Appl.Envir.Microbiol.33:1204 (1977)

35) LAU,W.K., und L.S.YOUNG:
Trimethoprim-Sulfamethoxazole treatment of Pneumocystis carinii in adults.
New Engl.J.Med.295:716 (1976)

36) LEMERLE,J., C.BACKES, D.LALLEMAND, J.-A.LEJEUNE und P.REINERT:
Pneumopathies interstitielles chez les enfants traités pour affections malignes.
Arch.Franc.Péd.33:569 (1976)

37) LIPSON,A., W.C.MARSHALL und A.R.HAYWARD:
Treatment of Pneumocystis carinii in children.
Arch.Dis.Child.52:314 (1977)

38) McLENNAN,G., R.ANTIC, A.E.SEYMOUR, P.A.FRITH und A.R.CLARKSON:
Pneumocystis Carinii Pneumonitis successfully treated with Trimethoprim-Sulphamethoxazole.
Aust.N.Z.J.Med.7:299 (1977)

39) MURRAY,J.F.:
Diffuse infiltrative diseases of the lung.
Harrison's principles of internal medicine, chap.260, p.1368 (8th ed. 1977)

40) NORMAN,L., und I.G.KAGAN:
A preliminary report of an indirect fluorescent antibody test for detecting antibodies to cysts of Pneumocystis carinii in human sera.
Amer.J.Cli.Path.58:170 (1972)

41) NORMAN,L., und I.G.KAGAN:
Some observations on the serology of Pneumocystis carinii infections in the United States.
Infect.Immunol.8:317 (1973)

42) OGILVIE,C.M.:
Todays Treatment: Diseases of the respiratory system - Pneumonia.
British Med.J.6115:771 (1978)

43) PIFER,L.L., und W.T.HUGHES:
Cultivation of Pneumocystis carinii in vitro.
Pediat.res.9:344 (1975)

44) PIFER,L.L., W.T.HUGHES und M.J.MURPHY:
Propagation of Pneumocystis carinii in vitro.
Pediat.res.11:305 (1977)

45) RAY,C.G.:
Pneumocystis carinii pneumonia.
Harrison's principles of internal medicine, chap.219, p.1084 (8th ed.1977)

46) REDMAN,J.C.:
Pneumocystis carinii Pneumonia in an Adopted Vietnamese Infant. A Case of Diffuse, Fulminant Disease, With Recovery.
J.Amer.Med.Ass.230:1561 (1974)

47) RUEBUSH:
An outbreak of Pneumocystis carinii pneumonia in children with acute lymphocytic leukemia.
Amer.J.Dis.Child.132:143 (1978)

48) STUMMVOLL,H.K., W.PINGGERA, A.WOLF, E.LOBENWEIN
F.PANTUCEK und J.KRENN:
Pneumocystis-Carinii-Infektion nach Nierentransplantation.
Schweiz.Med.Wschr.105:329 (1975)

49) VANEK,J., und O.JIROVEK:
Parasitäre Pneumonie. Interstitielle Plasmazellen-
-Pneumonie der Frühgeborenen verursacht durch
Pneumocystis carinii.
Zbl.Bakt.158:120 (1952)

50) VANEK,J., O.JIROVEK und J.LUKES:
Interstitial plasma cell pneumonia in infants.
Ann.Paediat.180:1 (1953)

51) VESSAL,K., W.DUTZ, E.KOHOUT und C.POST:
Verlaufskontrolle der Pneumocystose im Röntgenbild.
Radiologe 16:38 (1976)

52) VIVELL,O.:
Über eine neue serodiagnostische Methode bei der
interstitiellen plasmazellulären Pneumonie junger
Säuglinge und Frühgeburten.
Dtsch.Med.Wschr.79:358 (1954)

53) WELLER,R.:
Zur Erzeugung von Pneumocystosen im Tierversuch.
Z.Kinderheilk.76:366 (1955)

54) WILMANNS,W.:
Immunbiologische Grundlagen der medikamentösen
Immunsuppression.
Medikamentöse Immunsuppression, Seite 3 (Thieme 1971)

Lebenslauf

Am 1.Oktober 1952 kam ich als zweitältestes von drei Kindern des Regierungsbaumeisters Herbert Opp und seiner Ehefrau Ilse, geb. Eilenstein, in München zur Welt. In Oberschleissheim bei München erlebte ich meine Kindheit und besuchte dort bis 1963 die Volksschule. Als Zehnjähriger bestand ich die Aufnahmeprüfung am humanistischen Dom-Gymnasium in Freising, dessen neusprachlichen Zweig ich als Fahrschüler bis zu meinem Abitur 1972 besuchte.

Im Wintersemester 1972/73 begann ich, an der Ludwigs--Maximilians-Universität in München Medizin zu studieren. August 1974 legte ich das Physikum ab, im März 1976 folgte das 1.Staatsexamen und im März 1978 das 2.Staatsexamen.
Am 26.April 1979 bestand ich die ärztliche Prüfung.
Am 2.Mai 1979 wurde mir die Approbation erteilt.